

Rec'd PCT/PTO 27 DEC 2004  
PCT/JP 03/08179

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

27.06.03

#3

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2002年 6月28日

REC'D 15 AUG 2003

WIPO PCT

出 願 番 号  
Application Number: 特願2002-190909  
[ST. 10/C]: [JP2002-190909]

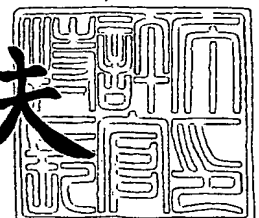
出 願 人  
Applicant(s): セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社  
第一製薬株式会社

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 7月31日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2003-306093

【書類名】 特許願

【整理番号】 NP02-1053

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61P 25/00  
C12N 09/12  
C12Q 01/48

【発明の名称】 MK K 7 と J I K の相互作用阻害剤

【請求項の数】 21

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県千葉市美浜区中瀬 1 丁目 3 番地  
幕張テクノガーデン D 棟 1 7 階  
セレスター・レキシコ・サイエンス株式会社内

【氏名】 土居 洋文

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県千葉市美浜区中瀬 1 丁目 3 番地  
幕張テクノガーデン D 棟 1 7 階  
セレスター・レキシコ・サイエンス株式会社内

【氏名】 細木 信也

【発明者】

【住所又は居所】 東京都江戸川区北葛西 1 丁目 1 6 番 1 3 号  
第一製薬株式会社 東京研究開発センター内

【氏名】 和田 直也

【特許出願人】

【識別番号】 500520628

【氏名又は名称】 セレスター・レキシコ・サイエンス株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 000002831

【氏名又は名称】 第一製薬株式会社

## 【代理人】

【識別番号】 100088904

【弁理士】

【氏名又は名称】 庄司 隆

【電話番号】 03-3864-6572

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 067070

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 MKK7とJIKの相互作用阻害剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 JNK/SAPK-インヒビトリ キナーゼ (JNK/SAPK-inhibitory kinase) (JIK) とMAPキナーゼキナーゼ7 (MKK7) の結合阻害、および/またはJIKによるMKK7のリン酸化の阻害を特徴とする、c-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junリン酸化阻害剤。

【請求項2】 JNK/SAPK-インヒビトリ キナーゼ (JNK/SAPK-inhibitory kinase) (JIK) とMAPキナーゼキナーゼ7 (MKK7) の結合阻害、および/またはJIKによるMKK7のリン酸化の阻害を特徴とする、c-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junリン酸化の阻害方法。

【請求項3】 JNK/SAPK-インヒビトリ キナーゼ (JNK/SAPK-inhibitory kinase) (JIK) とMAPキナーゼキナーゼ7 (MKK7) の結合阻害、および/またはJIKによるMKK7のリン酸化の阻害を特徴とする、c-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junリン酸化に基づく疾患の防止剤および/または治療剤。

【請求項4】 JNK/SAPK-インヒビトリ キナーゼ (JNK/SAPK-inhibitory kinase) (JIK) とMAPキナーゼキナーゼ7 (MKK7) の結合阻害、および/またはJIKによるMKK7のリン酸化の阻害を特徴とする、神経変性疾患の防止剤および/または治療剤。

【請求項5】 JNK/SAPK-インヒビトリ キナーゼ (JNK/SAPK-inhibitory kinase) (JIK) とMAPキナーゼキナーゼ7 (MKK7) の結合阻害、および/またはJIKによるMKK7のリン酸化の阻害を特徴とする、c-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junリン酸化に基づく疾患の防止方法および/または治療方法。

【請求項6】 JNK/SAPK-インヒビトリ キナーゼ (JNK/SAPK-inhibitory kinase) (JIK) とMAPキナーゼキ

ナーゼ7 (MKK7) の結合阻害、および／またはJIKによるMKK7のリン酸化の阻害を特徴とする、神経変性疾患の防止方法および／または治療方法。

【請求項7】 JNK/SAPK-インヒビトリ キナーゼ (JNK/SAPK-inhibitory kinase) (JIK) とMAPキナーゼキナーゼ7 (MKK7) の結合を阻害する化合物の同定方法であって、化合物とJIKおよび／またはMKK7の結合を可能にする条件下で、JIKおよび／またはMKK7と化合物を接触させ、次いで、JIKとMKK7の結合により生じるシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用い、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、化合物がJIKとMKK7の結合を阻害するかどうかを決定する方法。

【請求項8】 JNK/SAPK-インヒビトリ キナーゼ (JNK/SAPK-inhibitory kinase) (JIK) によるMAPキナーゼキナーゼ7 (MKK7) のリン酸化を阻害する化合物の同定方法であって、JIKおよび／またはMKK7と化合物を接触させ、MKK7のリン酸化を検出することのできるシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用い、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、化合物がJIKによるMKK7のリン酸化を阻害するかどうかを決定する方法。

【請求項9】 請求項7または8に記載の方法によって得られた化合物。

【請求項10】 JNK/SAPK-インヒビトリ キナーゼ (JNK/SAPK-inhibitory kinase) (JIK) とMAPキナーゼキナーゼ7 (MKK7) の結合を阻害する化合物。

【請求項11】 JNK/SAPK-インヒビトリ キナーゼ (JNK/SAPK-inhibitory kinase) (JIK) によるMAPキナーゼキナーゼ7 (MKK7) のリン酸化を阻害する化合物。

【請求項12】 JNK/SAPK-インヒビトリ キナーゼ (JNK/SAPK-inhibitory kinase) (JIK) とMAPキナーゼキナーゼ7 (MKK7) の結合阻害剤。

【請求項13】 JNK/SAPK-インヒビトリ キナーゼ (JNK/

SAPK-inhibitory kinase) (JIK) によるMAPキナーゼキナーゼ7 (MKK7) のリン酸化阻害剤。

【請求項14】 請求項9から11のいずれか1項に記載の化合物または請求項12若しくは13に記載の阻害剤を少なくとも1種以上含有してなる医薬組成物。

【請求項15】 請求項9から11のいずれか1項に記載の化合物または請求項12若しくは13に記載の阻害剤を少なくとも1種以上含有してなる、c-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junリン酸化に基づく疾患の防止剤および／または治療剤。

【請求項16】 請求項9から11のいずれか1項に記載の化合物または請求項12若しくは13に記載の阻害剤を少なくとも1種以上含有してなる、神経変性疾患の防止剤および／または治療剤。

【請求項17】 前記神経変性疾患が、ポリグルタミン病、ハンチントン病、脊髄小脳失調症、球脊髄性筋萎縮症、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、アルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン病、Lewy小体型痴呆症、多系統萎縮症、家族性筋萎縮性側索硬化症、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、pick病、ファミリーアルプリティッシュデメンチア (familial British dementia)、クロイツフェルトーヤコブ (Creutzfeldt-Jakob) 病、ゲルストマンーストランスラー (Gerstmann-Strausler) 症候群、狂牛病 (ウシ海綿状脳症) (BSE)、ニューロセルピン (neuroserpin) 封入体を伴う家族性痴呆症、または虚血や再灌流による神経細胞死を伴う疾患である請求項4若しくは16に記載の防止剤および／または治療剤。

【請求項18】 請求項9から11のいずれか1項に記載の化合物または請求項12若しくは13に記載の阻害剤を少なくとも1種以上使用することを特徴とする、c-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junリン酸化に基づく疾患の防止方法および／または治療方法。

【請求項19】 請求項9から11のいずれか1項に記載の化合物または請求項12若しくは13に記載の阻害剤を少なくとも1種以上使用することを特徴

とする、神経変性疾患の防止方法および／または治療方法。

【請求項20】 前記神経変性疾患が、ポリグルタミン病、ハンチントン病、脊髄小脳失調症、球脊髄性筋萎縮症、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、アルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン病、Lewy小体型痴呆症、多系統萎縮症、家族性筋萎縮性側索硬化症、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、pick病、ファミリアル プリティッシュ デメンチア (familial British dementia)、クロイツフェルトーヤコブ (Creutzfeldt-Jakob) 病、ゲルストマンーストランスラー (Gerstmann-Stranssler) 症候群、狂牛病 (ウシ海綿状脳症) (BSE)、ニューロセルピン (neuroserpin) 封入体を伴う家族性痴呆症、または虚血や再灌流による神経細胞死を伴う疾患である請求項6若しくは19に記載の防止方法および／または治療方法。

【請求項21】 JNK/SAPK-インヒビトリ キナーゼ (JNK/SAPK-inhibitory kinase) (JIK) および／若しくは MAPキナーゼキナーゼ7 (MKK7)、またはJIKをコードするポリヌクレオチドおよび／若しくはMKK7をコードするポリヌクレオチド、またはJIKをコードするポリヌクレオチドを含有するベクターおよび／若しくはMKK7をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターを少なくとも含んでなる試薬キット。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

##### 【産業上の利用分野】

本発明は、MAPキナーゼキナーゼ7 (MKK7) とJNK/SAPK-インヒビトリ キナーゼ (JNK/SAPK-inhibitory kinase) (以下、JIKと略称する) の相互作用を阻害すること、すなわち、JIKがMKK7に結合して直接MKK7をリン酸化することによるMKK7の活性化を阻害すること、を特徴とする、c-Jun N末端キナーゼ3 (JNK3) によるc-Junリン酸化の阻害、JNK3によるc-Junリン酸化に基づく疾患の改善、並びに神経変性疾患の改善に関する。

## 【0002】

## 【従来の技術】

各種刺激（グルコース枯渇、カルシウム濃度恒常性の変化、活性酸素等）により、小胞体（以下、ERと呼ぶこともある）におけるタンパク質のフォールディング（folding）の過程に異常が起こり、ER内に異常タンパク質が蓄積すると、ERストレスが生じる。ERストレスが生じると、小胞内分子シャペロンの発現が誘導され（unfolded protein response: UPR）、フォールディング異常（misfolding）の解消へと向かう。この過程で、ERストレスのセンサータンパク質として働いているものとして、IRE1が知られている（Urano F. et al., J. Cell Sci. 113:3697-3702, 2000）。

## 【0003】

一方、ERストレスが過剰に負荷されると、アポトーシス（apoptosis）が誘導される。虚血またはポリグルタミンやアミロイド $\beta$ （以下、 $A\beta$ と略称する）などの異常タンパク質の蓄積は、ERストレスを生じさせると考えられることから、ERストレスによる神経細胞死と神経変性疾患との関わりが指摘されている。

## 【0004】

ERストレスは、c-Jun N末端キナーゼ（以下、JNKと略称する）の活性化をも引き起こす。この過程に、IRE1およびTRAF2が関与していることが報告されている（Urano F. et al., science 287:664-666, 2000）。すなわち、IRE1破壊細胞株ではERストレスによるJNK活性化が抑制され、また、IRE1の過剰発現によりJNKが活性化する。さらに、IRE1はTRAF2と結合し、また、TRAF2のドミナントネガティブ変異体（dominant negative mutant）はIRE1によるJNKの活性化を阻害する。

## 【0005】

ERストレスによる細胞死が、MAPキナーゼキナーゼファミリーに属するMKK4およびMKK7の各々のドミナントネガティブ変異体により抑制されるこ



とから、ERストレスによる細胞死誘導に、MKK4またはMKK7を介したJNK活性化が関与している可能性がある(Zhang C. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 289:718-724, 2001)。MKK4は、JNKをリン酸化して活性化させるだけでなく、同じくMAPKファミリーの一員であるERK2やp38もリン酸化して活性化させる。一方、MKK7は、MAPKK7、MAP2K7、JNKK2とも呼ばれ、JNKを特異的にリン酸化して活性化させる(Moriguchi T. et al., EMBO J. 16:7045-7053, 1997; Foltz I. et al., J. Biol. Chem. 273:9344-9351, 1998)。MKK4遺伝子を破壊した胚性幹細胞(ES細胞)においても浸透圧刺激または紫外線によるJNK活性化が認められることから(Yang D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94:3004-3009, 1997)、MKK7は、MKK4と独立してJNKの活性化に働いていると考えられている。

#### 【0006】

JIK(DPKとも呼ぶ)は、イーストSte20p蛋白質のヒト相同体であるSTE20に関連したセリン/スレオニンキナーゼ(STE20-related serine/threonine kinase)の一つで、JNKシグナル伝達経路との関与が報告されている。例えば、上皮増殖因子(EGF)刺激によるJNK活性化をJIKは阻害し、その際、JIK自身の活性も抑制される(Tassi E. et al., J. Biol. Chem. 274:33287-33295, 1999)。また、JIKの過剰発現はJNKの活性化を引き起こす(Zhang W. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 274:872-879, 2000)。一方、JIKは、IRE1およびTRAF2と結合し、ERストレスによるJNK活性化に関与していることが示唆されている。すなわち、JIKの過剰発現はERストレスによるJNK活性化を増強し、JIKの活性部位欠失変異体はERストレスによるJNK活性化を抑制する(Yoneda T. et al., J. Biol. Chem. 276:13935-13940, 2001)。

## 【0007】

## 【発明が解決しようとする課題】

このような現状を鑑みると、ERストレスによるJNK活性化機構のいずれかの段階を阻害することは、JNKのシグナル伝達経路の活性化によって引き起こされる細胞のアポトーシスに基づく疾患、具体的には神経変性疾患などの解明並びに防止および／または治療につながると考えられる。その一例として、MKK7と相互作用する蛋白質を見出して、MKK7の活性化を阻害することはJNKの活性化を阻害することとなる。

## 【0008】

本発明の課題は、MKK7と相互作用する蛋白質を見出し、該蛋白質によるMKK7のリン酸化によりJNKシグナル伝達経路が活性化することによって引き起こされる疾患、例えば細胞のアポトーシスに基づく疾患、具体的には神経変性疾患などの防止および／または治療の手段を提供しようとするものである。

## 【0009】

## 【課題解決のための手段】

上記課題を解決すべく本発明者らは鋭意努力し、MKK7がJIKと相互作用することをインシリコ (in silico) で予測して、実験的に証明し、該相互作用の結果、JIKによりMKK7がリン酸化されてJNK3シグナル伝達経路を活性化することを見出して、本発明を完成した。

## 【0010】

すなわち本発明は、

- (1) JIKとMAPキナーゼキナーゼ7 (MKK7) の結合阻害、および／またはJIKによるMKK7のリン酸化の阻害を特徴とする、c-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junリン酸化阻害剤、
- (2) JIKとMAPキナーゼキナーゼ7 (MKK7) の結合阻害、および／またはJIKによるMKK7のリン酸化の阻害を特徴とする、c-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junリン酸化の阻害方法、
- (3) JIKとMAPキナーゼキナーゼ7 (MKK7) の結合阻害、および／またはJIKによるMKK7のリン酸化の阻害を特徴とする、c-Jun N末端

キナーゼ 3 による c-J u n リン酸化に基づく疾患の防止剤および／または治療剤、

(4) J I K と M A P キナーゼキナーゼ 7 (M K K 7) の結合阻害、および／または J I K による M K K 7 のリン酸化の阻害を特徴とする、神経変性疾患の防止剤および／または治療剤、

(5) J I K と M A P キナーゼキナーゼ 7 (M K K 7) の結合阻害、および／または J I K による M K K 7 のリン酸化の阻害を特徴とする、c-J u n N 末端キナーゼ 3 による c-J u n リン酸化に基づく疾患の防止方法および／または治療方法、

(6) J I K と M A P キナーゼキナーゼ 7 (M K K 7) の結合阻害、および／または J I K による M K K 7 のリン酸化の阻害を特徴とする、神経変性疾患の防止方法および／または治療方法、

(7) J I K と M A P キナーゼキナーゼ 7 (M K K 7) の結合を阻害する化合物の同定方法であって、化合物と J I K および／または M K K 7 の結合を可能にする条件下で、J I K および／または M K K 7 と化合物を接触させ、次いで、J I K と M K K 7 の結合により生じるシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用い、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、化合物が J I K と M K K 7 の結合を阻害するかどうかを決定する方法、

(8) J I K による M A P キナーゼキナーゼ 7 (M K K 7) のリン酸化を阻害する化合物の同定方法であって、J I K および／または M K K 7 と化合物を接触させ、M K K 7 のリン酸化を検出することのできるシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用い、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、化合物が J I K による M K K 7 のリン酸化を阻害するかどうかを決定する方法、

(9) 前記 (7) または (8) の方法によって得られた化合物、

(10) J I K と M A P キナーゼキナーゼ 7 (M K K 7) の結合を阻害する化合物、

(11) J I K による M A P キナーゼキナーゼ 7 (M K K 7) のリン酸化を阻害

する化合物、

(12) J I KとMAPキナーゼキナーゼ7 (MKK7) の結合阻害剤、

(13) J I KによるMAPキナーゼキナーゼ7 (MKK7) のリン酸化阻害剤

(14) 前記(9) から(11) のいずれかの化合物または前記(12) 若しくは(13) の阻害剤を少なくとも1種以上含有してなる医薬組成物、

(15) 前記(9) から(11) のいずれかの化合物または前記(12) 若しくは(13) の阻害剤を少なくとも1種以上含有してなる、c-J u n N末端キナーゼ3によるc-J u nリン酸化に基づく疾患の防止剤および／または治療剤

(16) 前記(9) から(11) のいずれかの化合物または前記(12) 若しくは(13) の阻害剤を少なくとも1種以上含有してなる、神経変性疾患の防止剤および／または治療剤、

(17) 前記神経変性疾患が、ポリグルタミン病、ハンチントン病、脊髄小脳失調症、球脊髄性筋萎縮症、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、アルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン病、L e w y小体型痴呆症、多系統萎縮症、家族性筋萎縮性側索硬化症、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、p i c k病、ファミリーアル プリティッシュ デメンチア (f a m i l i a l B r i t i s h d e m e n t i a)、クロイツフェルトーヤコブ (C r e u t z f e l d t - J a k o b) 病、ゲルストマンーストランスラー (G e r s t m a n n - S t r a n s s l e r) 症候群、狂牛病 (ウシ海綿状脳症) (B S E)、ニューロセルピン (n e u r o s e r p i n) 封入体を伴う家族性痴呆症、または虚血や再灌流による神経細胞死を伴う疾患である前記(4) 若しくは(16) の防止剤および／または治療剤、

(18) 前記(9) から(11) のいずれかの化合物または前記(12) 若しくは(13) の阻害剤を少なくとも1種以上使用することを特徴とする、c-J u n N末端キナーゼ3によるc-J u nリン酸化に基づく疾患の防止方法および／または治療方法、

(19) 前記(9) から(11) のいずれかの化合物または前記(12) 若しくは

は(13)の阻害剤を少なくとも1種以上使用することを特徴とする、神経変性疾患の防止方法および／または治療方法、

(20) 前記神経変性疾患が、ポリグルタミン病、ハンチントン病、脊髄小脳失調症、球脊髄性筋萎縮症、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、アルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン病、Lewy小体型痴呆症、多系統萎縮症、家族性筋萎縮性側索硬化症、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、pick病、ファミリーアルプリティッシュデメンチア(familial British dementia)、クロイツフェルトーヤコブ(Creutzfeldt-Jakob)病、ゲルストマンーストランスラー(Gerstmann-Stransler)症候群、狂牛病(ウシ海綿状脳症)(BSE)、ニューロセルピン(neuroserpin)封入体を伴う家族性痴呆症、または虚血や再灌流による神経細胞死を伴う疾患である前記(6)若しくは(19)の防止方法および／または治療方法、

(21) JIKおよび／若しくはMAPキナーゼキナーゼ7(MKK7)、またはJIKをコードするポリヌクレオチドおよび／若しくはMKK7をコードするポリヌクレオチド、またはJIKをコードするポリヌクレオチドを含有するベクターおよび／若しくはMKK7をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターを少なくとも含んでなる試薬キット、  
からなる。

## 【0011】

### 【発明の実施の形態】

(MKK7のJIKとの結合およびJIKによるリン酸化)

本発明においては、MAPキナーゼキナーゼ7(以下、MKK7と略称する)と相互作用する蛋白質を国際公開WO01/67299号公報記載の方法に従ってインシリコ(in silico)で予測し、その結果、該蛋白質がSTE20に関連したセリン／スレオニンキナーゼの一つ、JIKであることを見出し、実験的に、JIKがMKK7と結合すること、さらにJIKが直接MKK7をリン酸化すること、を初めて見出した。また、JIKの過剰発現により、c-Jun N末端キナーゼ3(以下、JNK3と略称する)が活性化されてc-Jun

がリン酸化されることを確認した。これらから、J I KがMKK 7を直接リン酸化することによりJNK 3シグナル伝達経路が活性化されることが明らかになった。

#### 【0012】

(MKK 7とJ I Kの結合阻害および／またはJ I KによるMKK 7のリン酸化の阻害による神経変性疾患の防止剤・治療剤並びに防止方法・治療方法)

これまでに、J I KがERストレスによるJNK活性化に関与していることが示唆されている。すなわち、J I Kの過剰発現はERストレスによるJNK活性化を増強し、J I Kの活性部位欠失変異体はERストレスによるJNK活性化を抑制する(Yoneda T. et al., J. Biol. Chem. 276: 13935-13940, 2001)。JNKは、MAPキナーゼファミリーの一つであり、古典的MAPキナーゼとは異なり、増殖刺激ではほとんど活性化せず、細胞に対するストレス(DNA損傷、紫外線、熱、高浸透圧、ERストレス、活性酸素など)や炎症性サイトカイン(TNF、IL1など)により活性化する。活性化されたJNKは、細胞質から核内へ移行し、c-Junなどの転写因子のリン酸化を介して標的遺伝子の発現を制御すると考えられている。哺乳類には、3つのJNK遺伝子(JNK1、JNK2、およびJNK3)が見出されている。このうち、JNK3は脳神経系などに特異的に発現している。

#### 【0013】

よって、ERストレスにより、J I Kが活性化され、活性化されたJ I KがMKK 7に結合して直接リン酸化してこれを活性化させ、その結果JNK 3が活性化してc-Junがリン酸化され、生理活性が発現する、例えば神経細胞死が誘導される、というシグナル伝達経路の存在が示唆された。すなわち、J I KとMKK 7の結合および／またはJ I KによるMKK 7のリン酸化を阻害することにより、JNK 3の活性化によるc-Junのリン酸化を阻害することができるため、ひいてはERストレスによるJNK 3シグナル伝達経路の活性化によって引き起こされる疾患、例えば細胞のアポトーシスに基づく疾患、具体的には、神経変性疾患などの防止および／または治療が可能である。神経変性疾患としては、次に挙げる例に限定されるものではないが、ポリグルタミン病(例えばハンチン

トン病、脊髄小脳失調症、球脊髄性筋萎縮症、および歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症など）、アルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン病、Lewy小体型痴呆症、多系統萎縮症、家族性筋萎縮性側索硬化症、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、pick病、ファミリーアルプリティッシュデメンチア（familial British dementia）、クロイツフェルトーヤコブ（Creutzfeldt-Jakob）病、ゲルストマンーストランスラー（Gerstmann-Stranssler）症候群、狂牛病（ウシ海綿状脳症）（BSE）、およびニューロセルピン（neuroserpin）封入体を伴う家族性痴呆症などが挙げられる（細胞工学、第20巻、第11号、2001年、特集：神経変性疾患の発症メカニズムと治療への展望）。また、虚血や再灌流による神経細胞死の防止および／または治療が可能である。

#### 【0014】

従って本発明は、JIKとMKK7の結合阻害および／またはJIKによるMKK7のリン酸化の阻害を特徴とした、JNK3によるc-Junリン酸化の阻害剤、JNK3によるc-Junリン酸化の阻害方法、さらにはJNK3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患、例えば神経変性疾患などの防止剤および／または治療剤並びに防止方法および／または治療方法を提供可能である。

#### 【0015】

（JIKとMKK7の結合およびJIKによるMKK7のリン酸化を阻害する化合物の同定方法）

本発明においては、上記知見に基づいて、JIKとMKK7の結合および／またはJIKによるMKK7のリン酸化を阻害する化合物の同定方法を提供する。該同定方法は、自体公知の医薬品スクリーニングシステムを利用して構築可能である。化合物の同定に使用するJIKおよびMKK7は、これらを遺伝子工学的手法で発現させた細胞、無細胞系合成産物、化学合成産物、または該細胞や生体試料から調製したものであってよく、これらからさらに精製されたものであってもよい。また、JIKとMKK7の結合および両蛋白質の機能、例えばキナーゼ活性が阻害されなければ、N末端側やC末端側に別の蛋白質、例えばβ-ガラクトシダーゼ、IgGなどの免疫グロブリンFc断片、His-tag、Myc-

t a g、H A - t a g、または F L A G - t a g などのペプチドが、直接またはリンカーペプチドなどを介して間接的に、遺伝子工学的手法などを用いて付加されたものであってもよい。被検化合物としては、例えば化学ライブラリーや天然物由来の化合物、または J I K および M K K 7 の一次構造や立体構造に基づいてドラッグデザインして得られた化合物などが挙げられる。

#### 【0016】

例えば、J I K および／または M K K 7 と化合物の結合を可能にする条件を選択し、該条件下で J I K および／または M K K 7 と化合物とを接触させ、次いで、J I K および／または M K K 7 の結合を検出することのできるシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用い、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、J I K と M K K 7 の結合を阻害する化合物を同定可能である。ここでシグナルとは、そのもの自体がその物理的または化学的性質により直接検出され得るものを指し、マーカーとはそのものの物理的または生物学的性質を指標として間接的に検出され得るものを指す。シグナルとしてはルシフェラーゼ、グリーン蛍光蛋白質 (G F P)、および放射性同位体など、マーカーとしては、レポーター遺伝子、例えばクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (C A T) 遺伝子など、または検出用のエピトープタグ、例えば 6 × H i s - t a g など、公知のものが利用できる。これらのシグナルまたはマーカーの検出方法は当業者には周知のものである。

#### 【0017】

具体的には、例えば J I K または M K K 7 の一方を固相化し、他方をシグナルで標識化して用いて結合反応を行い、標識シグナルを定量的に測定するといった当業者に知られた一般的なインビトロ (i n v i t r o) における結合実験系に、化合物を加えて評価することにより、両蛋白質の結合を阻害する化合物を得ることができる。

#### 【0018】

あるいは、J I K および／または M K K 7 と化合物とを接触させ、M K K 7 のリン酸化を検出することのできるシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用い、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化



を検出することにより、J I KによるMKK 7のリン酸化を阻害する化合物を同定できる。蛋白質のリン酸化試験およびリン酸化蛋白質の定量は、自体公知の方法により実施可能である。簡便には、例えば後述する実施例に記載したようにJ I KとMKK 7とを放射性同位体 ( $^{32}\text{P}$ ) で標識したアデノシン三リン酸 (ATP) の存在下でインビトロで反応させ、反応後にSDS-PAGEにより蛋白質の分離を行い、得られた蛋白質のバンドを染色して検出し、リン酸化されたMKK 7に相当するバンドの放射活性を測定することにより実施できる。

#### 【0019】

または、J I KおよびMKK 7を共発現させた細胞を用い、該細胞と化合物とを接触させ、J I KとMKK 7の結合またはJ I KによるMKK 7のリン酸化を検出することのできるシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用い、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、J I KとMKK 7の結合および／またはJ I KによるMKK 7のリン酸化を阻害する化合物を同定できる。

#### 【0020】

上記細胞を使用した同定方法は、上記インビトロでの同定方法と組み合わせて使用できる。当該インビトロの同定方法により得られたJ I KとMKK 7の結合および／またはJ I KによるMKK 7のリン酸化を阻害する化合物を、細胞を使用した上記同定方法で再度試験することにより、有用な化合物をさらに選択し得る。

#### 【0021】

(J I KとMKK 7の結合およびJ I KによるMKK 7リン酸化の阻害剤および医薬組成物)

上記方法で得られた化合物は、J I KとMKK 7の結合阻害剤および／またはJ I KによるMKK 7のリン酸化の阻害剤として利用可能である。このような化合物としては、両蛋白質が相互作用する部位、例えば結合部位のアミノ酸配列からなるペプチドまたはオリゴペプチドを例示できる。このようなペプチドまたはオリゴペプチドは、J I KまたはMKK 7のアミノ酸配列から設計し、自体公知のペプチド合成法によって合成し、上記同定方法においてJ I KとMKK 7の結

合および／または J I K による M K K 7 のリン酸化を阻害するか否かを試験することにより同定可能である。また、J I K と M K K 7 の結合を阻害し得る抗体も上記化合物の 1 つとして例示できる。該抗体は、例えば両蛋白質自体、または両蛋白質が相互作用する部位のアミノ酸配列からなるペプチド若しくはオリゴペプチドを抗原として自体公知の抗体作製法により得ることができる。

#### 【0022】

上記選別された化合物、J I K と M K K 7 の結合阻害剤、および／または J I K による M K K 7 のリン酸化の阻害剤は、さらに生物学的有用性と毒性のバランスを考慮して選別することによって、医薬組成物として調製可能である。これらの化合物および阻害剤は、単独で使用することもできるし、複数を組み合わせて使用することも可能である。また、これら化合物および阻害剤は試薬として使用できる。該試薬は、例えば J N K 3 のシグナル伝達経路の機構を研究するために有用である。

#### 【0023】

J I K は M K K 7 に結合すると直接 M K K 7 をリン酸化してこれを活性化させ、その結果 J N K 3 が活性化して c - J u n がリン酸化される。従って、上記化合物、J I K と M K K 7 の結合阻害剤、J I K による M K K 7 のリン酸化阻害剤、J I K と M K K 7 の結合および／または J I K による M K K 7 のリン酸化を阻害することを特徴とした J N K 3 による c - J u n リン酸化阻害剤、または医薬組成物を用いることにより、J N K 3 による c - J u n リン酸化に基づく疾患、例えば E R ストレスによる細胞のアポトーシスに基づく疾患、具体的には、神経変性疾患などの防止および／または治療が可能である。

#### 【0024】

本発明に係る阻害剤または医薬組成物の処方は、適当な医薬担体と組み合わせて処方することが好ましい。かかる処方は、治療上有効量の上記化合物、上記阻害剤、または上記医薬組成物に、さらに医薬上許容される担体または賦形剤を含む。かかる担体としては、生理食塩水、緩衝化生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、およびそれらの混合物が挙げられるが、これらに限らない。処方投与経路に適したものを選択すればよく、該処方は当業者によ

く知られている。上記阻害剤または医薬組成物は、単独で使用してもよく、あるいは治療に必要な他の化合物または医薬と一緒に使用してもよい。

#### 【0025】

本発明に係る阻害剤または医薬組成物の投与形態は、全身投与であっても局所投与であってもよい。上記阻害剤または上記医薬組成物の全身投与の好ましい一態様は、注射、例えば静脈注射が挙げられる。皮下、筋肉内または腹腔内のような他の注射経路を用いることもできる。投与の別の態様は、腸溶処方またはカプセル処方がある。うまく処方されるならば、経口投与も可能である。さらに、胆汁酸塩またはフシジン酸または他の界面活性剤のような浸透剤を用いる経粘膜投与若しくは経皮投与を用いることもできる。局所的な投与においては、膏薬、パスタ、ゲルなどの形態での投与であってもよい。

#### 【0026】

必要な用量範囲は、上記阻害剤または上記医薬組成物の有効性、投与経路、処方の性質、対象の症状の性質、および担当医師の判断による。具体的には、適当な用量は、例えば対象の体重 1 kg あたり 0.1 ないし 100  $\mu$ g の範囲である。しかしながら、当該分野においてよく知られた最適化のための一般的な常套的実験を用いてこれらの用量の変更を行うことができる。

#### 【0027】

製剤化にあたっては、例えばペプチド、蛋白質、オリゴヌクレオチド、抗体、化合物など各対象の物性に応じた公知の製剤化手段を導入すればよい。具体的には、例えば散剤、丸剤、錠剤、カプセル製剤、水溶液製剤、エタノール溶液製剤、リボソーム製剤、脂肪乳剤、シクロデキストリンなどの包接体などの製剤化方法が利用できる。

散剤、丸剤、カプセル剤および錠剤は、ラクトース、グルコース、シュクロース、マンニトールなどの賦形剤、澱粉、アルギン酸ソーダなどの崩壊剤、マグネシウムステアレート、タルクなどの滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチンなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの界面活性剤、グリセリンなどの可塑剤などを用いて製造できる。錠剤やカプセルを製造するには、固体の製薬担体を用いられる。

懸濁剤は、水、シュクロース、ソルビトール、フラクトースなどの糖類、PEGなどのグリコール類、油類を使用して製造できる。

注射用の溶液は、塩溶液、グルコース溶液、または塩水とグルコース溶液の混合物からなる担体を用いて調製可能である。

リポソーム化は、例えばリン脂質を有機溶媒（クロロホルムなど）に溶解した溶液に、当該物質を溶媒（エタノールなど）に溶解した溶液を加えた後、溶媒を留去し、これにリン酸緩衝液を加え、振盪、超音波処理および遠心分離した後、上清を濾過処理して回収することにより行い得る。

脂肪乳剤化は、例えば当該物質、油成分（大豆油、ゴマ油、オリーブ油などの植物油、MCTなど）、乳化剤（リン脂質など）などを混合、加熱して溶液とした後に、必要量の水を加え、乳化機（ホモジナイザー、例えば高圧噴射型や超音波型など）を用いて、乳化・均質化処理して行い得る。また、これを凍結乾燥化することも可能である。なお、脂肪乳剤化するとき、乳化助剤を添加してもよく、乳化助剤としては、例えばグリセリンや糖類（例えばブドウ糖、ソルビトール、果糖など）が例示される。

シクロデキストリン包接化は、例えば当該物質を溶媒（エタノールなど）に溶解した溶液に、シクロデキストリンを水などに加温溶解した溶液を加えた後、冷却して析出した沈殿を濾過し、滅菌乾燥することにより行い得る。この際、使用されるシクロデキストリンは、当該物質の大きさに応じて、空隙直径の異なるシクロデキストリン（ $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  型）を適宜選択すればよい。

#### 【0028】

（試薬キット）

本発明は、試薬キットであって、J I KおよびMKK 7、またはJ I KをコードするポリヌクレオチドおよびMKK 7をコードするポリヌクレオチド、またはJ I Kをコードするポリヌクレオチドを含有するベクターおよびMKK 7をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターを少なくとも含んでなる試薬キットを提供する。J I KおよびMKK 7は、これらを遺伝子工学的手法で発現させた細胞、無細胞系合成産物、化学合成産物、または当該細胞や生体試料から調製したものであってよく、これらからさらに精製されたものであってもよい。また、

J I KとMKK 7の結合および両蛋白質の機能、例えばキナーゼ活性が阻害されなければ、N末端側やC末端側に別の蛋白質、例えば $\beta$ -ガラクトシダーゼ、Ig Gなどの免疫グロブリンFc断片、His-tag、Myc-tag、HA-tag、またはFLAG-tagなどのペプチドが、直接またはリンカーペプチドなどを介して間接的に、遺伝子工学的的手法などを用いて付加されたものであってもよい。J I KまたはMKK 7をコードするポリヌクレオチドは、ヒトcDNAライブラリーから自体公知の遺伝子工学的的手法により調製することができる。J I KまたはMKK 7をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターは、上記ポリヌクレオチドを適当な発現ベクターDNA、例えば細菌プラスミド由来のベクターに自体公知の遺伝子工学的的手法で導入することにより得られる。これらは試薬であるとき、J I KとMKK 7の結合やJ I KによるMKK 7のリン酸化を検出するためのシグナルおよび／またはマーカー、バッファー、並びに塩など、必要とされる物質を含むことができる。さらに、安定化剤および／または防腐剤などの物質を含んであってもよい。なお、製剤化にあたっては、使用する各物質それぞれに応じた製剤化手段を導入すればよい。

#### 【0029】

##### 【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されない。

#### 【0030】

##### 【実施例1】

(MKK 7と相互作用する蛋白質のインシリコでの探索)

MKK 7と相互作用する蛋白質を、国際公開第WO 01/67299号公報に記載の予測方法に従って予測した。すなわち、MKK 7のアミノ酸配列をある長さのオリゴペプチドに分解し、各オリゴペプチドのアミノ酸配列あるいはそのアミノ酸配列と相同なアミノ酸配列を持った蛋白質をデータベース中で検索し、得られた蛋白質とMKK 7との間でローカルアライメントを行い、ローカルアライメントのスコアの高いものをMKK 7と相互作用すると予測した。ここではローカルアライメントのスコアを、国際公開第WO 01/67299号公報に記載の

方法と同様に、25.0以上とした。

### 【0031】

解析の結果、MKK7由来の6アミノ酸残基からなるオリゴペプチド、WSLGISおよびLEAKLK、と相同性のあるオリゴペプチド、WSLGITおよびLENKLKが、JIKのアミノ酸配列中に存在することが分かった。図1に、MKK7とJIKとのローカルアライメントの結果を示した。この結果から、JIKはMKK7と相互作用する蛋白質であると予測された。

### 【0032】

#### 【実施例2】

(JIKによるMKK7リン酸化の解析)

JIKによるMKK7のリン酸化を実験的に確認するために、免疫複合体リン酸化法を用いたインビトロにおけるリン酸化試験を実施した。

### 【0033】

#### <材料>

JIK発現プラスミドを次のように構築した。まず、ヒトJIKcDNAを、ヒト腎臓由来poly(A)<sup>+</sup>RNA(Clontech社)から逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)により獲得し、次いで動物細胞用発現ベクター、pcDNA3.1(+)(Invitrogen社)へ組み込んだ。そのとき、5'側にHA-tagコード配列を挿入し、動物細胞用N末端HA-tag付加型JIK発現プラスミド、pcDNA-HA-JIKを構築した。なお、クローニングしたJIKcDNAのアミノ酸翻訳配列は、NCBI(National Center for Biotechnology Information)の蛋白質データベースに開示されたアクセッション番号XP\_045006(登録遺伝子名:JIK)のものと同一である。

### 【0034】

下記組成からなる各溶液を実施例2、3、および4で用いた。

細胞溶解緩衝液(Cell lysis buffer): 20mM Tris-HCl, pH7.4 / 150mM NaCl / 1mM エチレンジアミン四酢酸(EDTA) / 1mM エチレングリコールビス四酢酸(EGTA) / 1%

Triton X-100/2.5 mM ピロリン酸ナトリウム (Na-pyrophosphate)/1mM  $\beta$ -グリセロホスフェート (glycerophosphate)/1mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ /プロテアーゼ阻害剤カクテル (protease inhibitor cocktail、Cell Signaling Technology社)。

キナーゼバッファー (Kinase buffer): 25mM Tris-HCl, pH7.5/5mM  $\beta$ -グリセロホスフェート/2mM ジチオスレイトール/0.1mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ /10mM  $\text{MgCl}_2$ 、Cell Signaling Technology社。

SDS サンプルバッファー (SDS sample buffer): 4% SDS/125mM Tris-HCl, pH6.8/20% グリセロール/0.01% ブロムフェノールブルー (BPB)/10%  $\beta$ -メルカプトエタノール (mercaptoethanol)。

#### 【0035】

##### <方法>

細胞数  $4 \times 10^5$  の HEK293T 細胞を  $37^\circ\text{C}$ /5%  $\text{CO}_2$  の条件下にて  $\phi$  60mm のシャーレ中で一晩培養した後、 $5\mu\text{g}$  の pcDNA-HA-JIK または陰性コントロールとして pcDNA3.1 (+) を、 $15\mu\text{l}$  の FuGENE6 トランスフェクション試薬 (FuGENE6 Transfection

Reagent、Roche社) を用いてトランスフェクトした。2日間培養後、細胞を氷冷した PBS (-) で洗浄して回収し、 $500\mu\text{l}$  の細胞溶解緩衝液に懸濁し、氷上で10分間放置した。その後、 $4^\circ\text{C}$  にて  $14\text{krpm}$  で10分間遠心処理することにより上清を回収し、細胞溶解物 (cell lysate) とした。次に、 $500\mu\text{l}$  の細胞溶解物に、アガロースに結合した正常マウス IgG (Agarose-conjugated normal mouse IgG、Sigma社)  $20\mu\text{l}$  を加え、 $4^\circ\text{C}$  にて30分間転倒混和した後、遠心処理により上清を回収した。回収した上清に  $20\mu\text{l}$  の抗HA アフィニティー マトリックス (anti-HA affinity matrix、Roche社) を加え、 $4^\circ\text{C}$  にて2時間転倒混和した後、遠心処理によりビーズを回収

し、さらにこのビーズを $500\mu\text{l}$ の細胞溶解緩衝液で2回、 $500\mu\text{l}$ のキナーゼバッファーで2回洗浄した。次に、ビーズに $1\mu\text{g}$ の基質と $10\mu\text{M}$ のATPおよび $5\mu\text{Ci}$ の $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  ( $3000\text{Ci}/\text{mmol}$ 、PerkinElmer社)を含む $25\mu\text{l}$ のキナーゼバッファーを加え、 $30^\circ\text{C}$ にて30分間リン酸化反応を行った。反応後、 $25\mu\text{l}$ の $2\times\text{SDS}$  サンプルバッファーを加え、5分間煮沸後、上清をSDS-PAGEにより分離し、BAS2000 (Fujifilm社)を用いたオートラジオグラフィーによりリン酸化蛋白質を検出した。なお、基質は、GST-MKK7の不活性体 (inactive GST-MKK7) (Upstate社)、または、陰性コントロールとしてGSTをそれぞれ使用した。

#### 【0036】

##### <結果>

図2に示したように、JIKによるGST-MKK7のリン酸化が認められた。また、このリン酸化はJIK非存在では認められなかったことから、GST-MKK7のリン酸化は自己リン酸化ではなく、JIKによるものであることが明らかとなった。なお、陰性コントロール用の基質として用いたGSTでは、リン酸化は認められなかった。

#### 【0037】

##### 【実施例3】

(MKK7とJIKの結合解析)

JIKとMKK7の結合を実験的に確認するために、細胞内共発現/免疫共沈降法による結合試験を実施した。

#### 【0038】

##### <材料>

MKK7発現プラスミドを次のように構築した。まず、ヒトMKK7 cDNAを、ヒト骨格筋由来poly(A)<sup>+</sup>RNA (Clontech社)からRT-PCRにより獲得し、次いで動物細胞用発現ベクター、pcDNA3.1 (+) (Invitrogen社)へ組み込んだ。その際、5'側にFLAG-tagコード配列を挿入し、動物細胞用N末端FLAG-tag付加型MKK7発現プ



ラスミド、p c DNA-FLAG-MKK7を構築した。

PAK4発現プラスミドは、実施例2で構築したものを用いた。

### 【0039】

#### <方法>

細胞数 $4 \times 10^5$ のHEK293T細胞を $37^{\circ}\text{C}/5\%\text{CO}_2$ の条件下にて $\phi$ 60mmシャーレ中で一晚培養した後、 $2\mu\text{g}$ のp c DNA-HA-JIKまたは陰性コントロールとしてp c DNA3.1 (+)を $2\mu\text{g}$ のp c DNA-FLAG-MKK7と共に、FuGENE6 Transfection Reagent (Roche社)を用いてトランスフェクトした。2日間培養後、細胞を氷冷したPBS (-)で洗浄して回収し、 $500\mu\text{l}$ の細胞溶解緩衝液に懸濁し、氷上で10分間放置した。その後、 $4^{\circ}\text{C}$ にて $14\text{krpm}$ で10分間の遠心処理により上清を回収し、細胞溶解物とした。次に、 $500\mu\text{l}$ の細胞溶解物に $20\mu\text{l}$ のAgarose-conjugated normal mouse IgG (Sigma社)を加え、 $4^{\circ}\text{C}$ にて30分間転倒混和した後、遠心処理により上清を回収した。回収した上清に $20\mu\text{l}$ のanti-HA affinity matrix (Roche社)を加え、 $4^{\circ}\text{C}$ にて一晚転倒混和した後、遠心処理によりビーズを回収した。ビーズを $500\mu\text{l}$ の細胞溶解緩衝液で3回、次いで $500\mu\text{l}$ のTBS (25mM Tris-HCl, pH7.5/150mM NaCl)で1回洗浄した後、 $20\mu\text{l}$ の2×SDS サンプルバッファーを加え、5分間加熱後、上清を5-20%のSDS-PAGEにより分離した。その後、抗FLAG M2抗体 (Sigma社)を用いたウェスタンブロッティングにより結合蛋白質を検出した。なお、検出はECL ウェスタンブロッティング検出キット (ECL western blotting detection kit, Amersham pharmacia biotech社)を使用した。

### 【0040】

#### <結果>

図3に示したように、抗HA抗体を用いてHA-JIKの免疫沈降を実施した結果、FLAG-MKK7の共沈降が認められた。HA-JIK非発現細胞では

FLAG-MKK7の共沈降は認められなかったことから、この共沈降はアガロースビーズへの非特異的結合ではなく、HA-JIKとFLAG-MKK7の結合を示すものであることが明らかとなった。これらから、JIKとMKK7が細胞内で結合することが判明した。

#### 【0041】

##### 【実施例4】

(JIKによるJNK3シグナル伝達経路の活性化)

JIKによるJNK3シグナル伝達経路の活性化を実験的に確認するために、インビトロにおけるJNK3リン酸化試験を、免疫複合体リン酸化法を用いて実施した。

#### 【0042】

##### <材料>

JNK3発現プラスミドを次のように構築した。まず、ヒトJNK3 cDNAを、ヒト海馬cDNAライブラリーからRT-PCRにより獲得し、次いで動物細胞用発現ベクター、p cDNA3.1 (+) (Invitrogen社)へ組み込んだ。その際、5'側にFLAG-tagコード配列を挿入し、動物細胞用N末端FLAG-tag付加型JNK3発現プラスミド、p cDNA-FLAG-JNK3を構築した。

PAK4発現プラスミドは、実施例2で構築したものを用いた。

#### 【0043】

また、c-Jun (1-79) (c-JunのN末端79アミノ酸領域であり、JNKによるリン酸化部位を含む)を、N末端にGST (Glutathione S-transferase) を付加した融合蛋白質〔以下、GST-c-Jun (1-79)〕として大腸菌にて発現後、グルタチオン セファロース 4B (Glutathione sepharose 4B) (Amersham Pharmacia biotech社)で精製し、使用した。

#### 【0044】

##### <方法>

細胞数 $4 \times 10^5$ のHEK293T細胞を $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$ の条件下にて $\phi$

60mmのシャーレ中で一晚培養した後、2 $\mu$ gのp cDNA-HA-J I Kまたは陰性コントロールとしてp cDNA 3.1 (+)を、2 $\mu$ gのp cDNA-FLAG-JNK3と共に、FuGENE6 Transfection Reagent (Roche社)を用いてトランスフェクトした。2日間培養後、細胞を氷冷したPBS (-)で洗浄して回収後、500 $\mu$ lの細胞溶解緩衝液に懸濁し、氷上で10分間放置した。その後、4℃にて14krpmで10分間遠心処理して上清を回収し、細胞溶解物とした。次に、500 $\mu$ lの細胞溶解物に20 $\mu$ lのAgarose-conjugated normal mouse IgG (Sigma社)を加え、4℃にて30分間転倒混和した後、遠心処理により上清を回収した。回収した上清に20 $\mu$ lのanti-FLAG M2 affinity gel (Sigma社)を加え、4℃にて2時間転倒混和した後、遠心処理によりビーズを回収し、さらにビーズを500 $\mu$ lの細胞溶解緩衝液で2回、500 $\mu$ lのキナーゼバッファーで2回洗浄した。次に、ビーズに基質として2 $\mu$ gのGST-c-Jun (1-79)と10 $\mu$ M ATPおよび5 $\mu$ Ciの $[\gamma$ - $^{32}$ P] ATP (3000Ci/mmol、PerkinElmer社)を含む25 $\mu$ lのキナーゼバッファーを加え、30℃にて30分間リン酸化反応を行った。反応後、25 $\mu$ lの2 $\times$ SDS サンプルバッファーを加え、100℃にて5分間処理後、上清を5-20% SDS-PAGEにより分離し、BAS2000 (Fujifilm社)を用いたオートラジオグラフィーによりリン酸化されたGST-c-Jun (1-79)を検出した。

#### 【0045】

##### <結果>

図4に示すように、HA-J I Kの過剰発現により、JNK3の活性、すなわちc-Junリン酸化活性、が上昇した。すなわち、J I KがJNK3シグナル伝達経路を活性化することが確認された。

#### 【0046】

以上の結果から、J I KがMKK7に結合してこれを直接リン酸化することにより、JNK3が活性化されてc-Junがリン酸化されること、すなわちJNK3シグナル伝達経路が活性化されることが明らかになった。

【0047】

## 【発明の効果】

本発明においては、J I KがMKK 7と結合すること、さらに、J I KによりMKK 7が直接リン酸化されてJNK 3シグナル伝達経路が活性化されることを初めて見出した。これまでに、J I Kが、ERストレスによるJNK活性化に関与していることが報告されているが、その機構は不明であった。ERストレスはJNKシグナル伝達経路の活性化を介して、神経細胞死を引き起こす。よって、ERストレスによるJNK 3シグナル伝達経路の活性化による神経細胞死において、J I KによるMKK 7のリン酸化が関与していることが示唆される。すなわち、J I KによるMKK 7のリン酸化を阻害すれば、JNK 3シグナル伝達経路の活性化によって引き起こされる神経細胞死を阻害することができる。これらのことから本発明は、ERストレスによるJNK 3シグナル伝達経路の活性化によって引き起こされる疾患、例えば神経細胞死に基づく疾患、具体的には、神経変性疾患の予防・治療のために、また、神経変性疾患やJNK 3シグナル伝達機構の研究のために、非常に有用である。

## 【図面の簡単な説明】

【図 1】 MKK7 と JIK との相互作用をインシリコで予測した結果を示す図面である。

【図 2】 JIK が、インビトロで MKK7 をリン酸化したことを示す図である。GST-MKK7 (レーン 1、2) および GST (レーン 3) を基質として、HA-JIK 存在下 (レーン 2、3) または非存在下 (レーン 1) にてリン酸化反応を行った結果を示す。矢頭は、リン酸化された GST-MKK7 および HA-JIK を示す。図に示した数値は、分子量マーカーの分子量である。

【図 3】 JIK と MKK7 が細胞内で結合することを示す図である。FLAG-MKK7 のみ発現させた細胞 (レーン 1) または FLAG-MKK7 および HA-JIK 共発現細胞 (レーン 2) の細胞溶解物 (cell lysate) を用いて、HA-JIK の発現確認 (上段)、FLAG-MKK7 の発現確認 (中段)、および免疫共沈降試験 (IP) (下段) を行った結果を示す。発現確認および免疫共沈降物の確認はウエスタンブロッティング (WB) により行った。

【図 4】 JIK の一過性発現により、JNK3 の活性 (c-Jun リン酸化活性) が上昇したことを示す図である。HA-JIK および FLAG-JNK3 のいずれも非発現の細胞 (レーン 1)、FLAG-JNK3 のみ発現させた細胞 (レーン 2)、または HA-JIK と FLAG-JNK3 を共発現させた細胞 (レーン 3) での、FLAG-JNK3 の GST-c-Jun (1-79) に対するリン酸化活性を示す。矢頭は、リン酸化された GST-c-Jun (1-79) (Phospho c-Jun) を示す。

【書類名】

図面

【図 1】

Score = 59.6

299 YDIRADVWSLGLSLVELA

198 YDGKVDIWSLGITCIELA

YD D WSLGI ELA

Score = 39.0

123 LGEMSGTGGQVWKMFRKTGHVIAVKQMRRSGNK

27 LHEIGHGSFGAVYFATNAHTSEVVAIKMSYSGKQ

L E G G G V T V A K M SG

Score = 30.1

7 EQKLSRLEAKLKQENREARRRI

472 QKQLIALENKLKAEMDEHRLKL

L LE KLK E E R

Score = 28.9

91 EIDQKLQEIMKQTGYL

61 QTHEKWQDILKEVKFL

K Q I K L

Score = 29.3

102 QTGYLTIGGQRYQAEINDL

761 QTRKLAILAEQYEQSINEM

QT L I Y IN

Score = 25.7

6 LEQKLSRLEAKLKQENRE

831 LEQRVSLRAHLEQKIEE

LEQ S A L Q E

Score = 26.4

111 QRYQAEINDLENL

291 QRTKDAVRELDNL

QR L NL

Score = 26.3

201 TCAEKLKKRM

558 ICKEKIKEEM

C EK K M

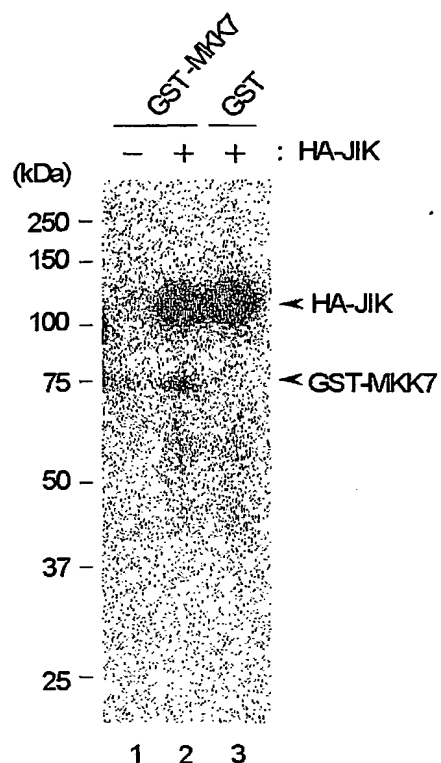
Score = 26.7

236 KHGVIHRDVKPSNILLD

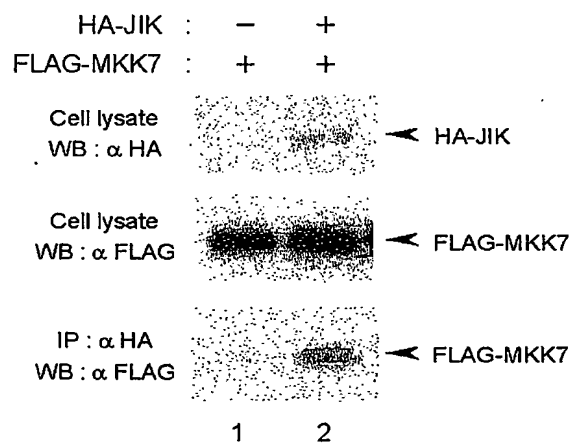
273 RHDFVRRD-RPLRVLID

H RD P L D

【図 2】

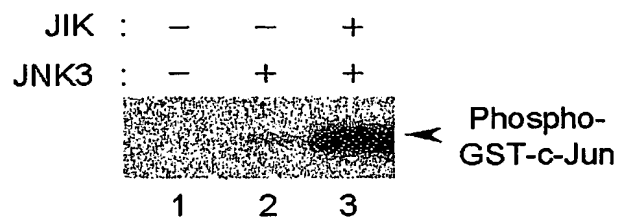


【図 3】



BEST AVAILABLE COPY

【図 4】



BEST AVAILABLE COPY



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 MKK7と相互作用する蛋白質を見出し、該蛋白質によるMKK7のリン酸化によりJNK3シグナル伝達経路が活性化して惹起される疾患、例えば神経変性疾患などの防止手段および治療手段を提供すること。

【解決手段】 JIKとMKK7の結合阻害および／またはJIKによるMKK7のリン酸化の阻害を特徴とするJNK3によるc-Junリン酸化阻害剤およびリン酸化阻害方法、JNK3によるc-Junリン酸化に基づく疾患の防止剤および／または治療剤並びに防止方法および／または治療方法、さらにJIKとMKK7の結合および／またはJIKによるMKK7のリン酸化を阻害する化合物の同定方法、該同定方法で得られた化合物、該化合物からなるJIKとMKK7の結合阻害剤および／またはJIKによるMKK7のリン酸化阻害剤、これらのうち少なくとも1種を含有してなる医薬組成物。

【選択図】 なし

特願 2002-190909

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[500520628]

1. 変更年月日

2000年10月26日

[変更理由]

新規登録

住 所

千葉県千葉市美浜区中瀬1丁目3番地 幕張テクノガーデンD  
17

氏 名

セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社

特願 2002-190909

出願人履歴情報

識別番号

[000002831]

1. 変更年月日      1990年 8月28日  
    [変更理由]      新規登録  
                    住 所      東京都中央区日本橋3丁目14番10号  
                    氏 名      第一製薬株式会社
  
2. 変更年月日      2003年 4月25日  
    [変更理由]      名称変更  
                    住所変更  
                    住 所      東京都中央区日本橋3丁目14番10号  
                    氏 名      第一製薬株式会社